Untersuchungen über Typhus- u. Paratyphus-Immunität in ihrer Beziehung zu bakteriziden Stoffen des inaktivierten Menschenserums.

Inaugural-Dissertation

der

hohen medizinischen Fakultät der Albertus-Universität zu Königsberg i. Pr.

zur Erlangung der Doktorwürde

in der Medizin, Chirurgie und Geburtshilfe

vorgelegt von

Edgar Wöhlisch,
prakt. Arzt
aus Danzig.

KÖNIGSBERG i. PR.
Buchdruckerei Otto Kümmel.
1917.

Gedruckt mit Genehmigung der hohen medizinischen Fakultät
der Königlichen Albertus-Universität zu Königsberg i. Pr.
Referent: Prof. Dr. Selter.

Meinen Eltern!

In der Deutschen Med. Wochenschrift, Jahrgang 38 No. 7, erschien 1912 eine Arbeit von *G. Seiffert* unter dem Titel »Beziehungen zwischen natürlicher Immunität und spezifischen Serumstoffen«.

Der Verfasser hatte es sich zur Aufgabe gemacht, die Frage zu klären, ob sich für die natürliche Immunität eines Organismus in vitro ein adäquater Ausdruck fände in der bakteriziden Wirkung des Serums auf bestimmte Krankheitserreger.

Versuche, die mit aktivem Serum verschiedener Tierarten und verschiedenen Bakterienarten angestellt wurden, führten zu keinem neuen Resultat. Dagegen ergaben sich höchst eigenartige Verhältnisse bei der in gleichem Sinne vorgenommenen Prüfung inaktivierter Sera.

Das Resultat dieser Versuche war, daß *Seiffert* das tatsächliche Bestehen bestimmter Beziehungen zwischen der natürlichen Immunität der durchgeprüften Tiere und dem bakteriziden Verhalten ihres inaktivierten Serums gegenüber den in Frage kommenden Erregern behauptet. Jedoch sind angeblich diese Beziehungen nicht einheitlich für alle Erreger, vielmehr äußern sie sich in völlig gegensätzlicher Weise bei zwei verschiedenen Gruppen von Erregern.

Diese Gruppen sind:

1. Die Erreger septikämischer Erkrankungen
2. die endotoxinbildenden Krankheitserreger.

Aus Gruppe 1 wurden untersucht: Milzbrand, Pest, Rotlauf, Hühnercholera, Strepto- u. Staphylokokken. Während sich bei Strepto- und Staphylokokken noch keine eindeutigen Resultate ergeben haben, bestehen nach *Seiffert* für die anderen Erreger die gesuchten Beziehungen zwischen Empfänglichkeit und Bakterizidie des inaktivierten Serums darin, daß »bei empfänglichen Tieren das Serum das Wachstum der Bakterien nicht hemmt, sondern begünstigt, daß das inaktive Serum unempfänglicher Tiere dagegen eine bakterizide und wachstumshemmende Wirkung auf die betreffenden Bakterien ausübt«.

Erscheint dies Ergebnis recht einleuchtend und glaubhaft und in gutem Einklang mit den Resultaten, die andre Autoren bei Versuchen mit aktivem Serum erhalten hatten, so erhielt *Seiffert* ein höchst paradoxes Resultat bei der Gruppe der endotoxinbildenden Krankheitserreger. Seine Versuche erstreckten sich auf die Erreger von Typhus, Paratyphus, Mäusetyphus, Cholera und Dysenterie und führten zu einem der ersten Gruppe diametral entgegengesetzten Ergebnis. Er fand nämlich, daß inaktiviertes Menschenserum Typhusbazillen abtötet, während sich bei den verschiedenen darauf geprüften Tierarten keine hemmenden Eigenschaften des inaktivierten Serums nachweisen ließen. Sera von Typhusrekonvaleszenten- und Bazillenträgern dagegen, also von Individuen, die mit großer Wahrscheinlichkeit gegen Typhus Immunität erworben hatten, waren unwirksam gegen Typhusbazillen, zeigten also das gleiche Verhalten, wie die Sera der von Natur gegen Typhus immunen Tiere.

Seiffert resümiert über die Versuche mit Typhusbazillen: »Es wurde keine Tierart gefunden, deren Serum im inaktiven Zustand Typhusbazillen gegenüber bakterizid wirkte. Diese bakterizide Eigenschaft kommt allein dem inaktiven Serum des Menschen zu, der allein eine Spontanempfänglichkeit für Typhus besitzt. Das Serum von Typhus-Bazillenträgern wie von vereinzelten Individuen verhält sich im Gegensatz zu den Sera der meisten Menschen wie Tierserum. Dieses Verhalten scheint als Symptom oder Ausdruck einer vorhandenen Immunität deutbar, während das bakterizide Verhalten, wie es beim Menschenserum die Regel ist, als Zeichen einer Typhusempfänglichkeit anzunehmen ist«.

Das gleiche Verhalten stellte *S.* auch für die anderen Erreger derselben Gruppe als Regel hin, also für Choleravibrionen, Shiga-Kruse-Bazillen sowie Para- und Mäusetyphusbazillen. So fand *S.* bei Versuchen mit Mäusetyphus im inaktiven Serum einer gegen diesen Erreger durch Impfung immunisierten weißen Maus, sowie einer spontan unempfänglichen grauen Maus keine hemmenden Eigenschaften, dagegen erwies sich das Serum der empfänglichen weißen Maus als sehr wirksam.

Die auf Grund seiner Versuche aufgestellte interessante Hypothese faßt *S.* am Schluß seiner ersten Arbeit in folgenden Sätzen zusammen:

»Im Serum finden sich Stoffe thermostabiler Natur, die auf Bakterien spezifische, wachstumsbeeinflussende Wirkungen ausüben. Diese Serumkörper stehen, wie Versuche bei einer größeren Zahl von Infektionskrankheiten ergeben, in Beziehungen zur natürlichen

Immunität der Art und des Individuums. Diese Beziehungen können aber nicht für alle Krankheiten in ein einheitliches Schema gebracht werden. Es hat sich gezeigt, daß für zwei Gruppen von Krankheiten ein entgegengesetztes Verhalten zwischen Serumstruktur und Empfänglichkeit angenommen werden muß. Bei den Krankheiten, deren Erreger leicht Endotoxine bilden können, ist Bakterizidie oder Entwicklungshemmung des inaktiven Serums ein Ausdruck für Empfänglichkeit, ungehemmtes Wachstum im inaktiven Serum ein Ausdruck der Immunität. Bei Infektionen, die septikämischer Natur sind, und bei denen die Bakterien zu schrankenloser Vermehrung im Innern der infizierten Individuen führen können, spricht ungehemmtes Wachstum im inaktiven Serum für Empfänglichkeit, Bakterizidie oder Hemmung des inaktiven Serums für völlige oder relative Immunität seines Besitzers«.

Sollten sich die Angaben *S's.* als richtig herausstellen, so käme ihnen zweifellos ein großes praktisches und theoretisches Interesse zu. Umsomehr mußte es Wunder nehmen, daß bis zum Erscheinen der zweiten Arbeit von *S.* im Jahre 1917 sich außer *P. Schou*, auf dessen Arbeit ich jetzt näher eingehe, anscheinend niemand mit der Nachprüfung der *Seiffert*'schen Resultate und der daraus abgeleiteten Hypothese befaßt hat.

P. Schou veröffentlichte seine unter Leitung *Neufelds* angestellten Versuche in der Zeitschrift für Hygiene Band 75. (»Beitrag zur Kenntnis der thermostabilen Serumstoffe und ihre Bedeutung für die Immunität«.) *Schou* prüfte die Verhältnisse bei den Septikämieerregern an der Hühnercholera, die für Kaninchen und Tauben

virulent, dagegen für den Menschen unschädlich ist, ferner an Rotlauf und am Bazillus Friedländer, und fand, daß gegenüber Septikämieerregern im inaktivierten Serum hochempfänglicher Tiere niemals Bakterizidie stattfand, während die Resultate bei unempfänglichen Tieren unregelmäßig waren.

Als Vertreter der endotoxinbildenden Bakterien untersuchte er Typhus und Cholera. Da uns die Verhältnisse bei Typhus ganz besonders interessieren, so sei auf diese Versuche hier eingegangen.

Schou prüfte 15 Serumproben von 11 Personen in 19 Versuchen, darunter waren 1 Bazillenträger und 1 Rekonvaleszent. Diese zeigten entsprechend den *Seiffert*'schen Angaben starkes Wachstum. Bei den normalen Personen waren dagegen die Resultate nicht ganz regelmäßig, da 3 von diesen ebenfalls starkes Wachstum zeigten, während das Verhalten der übrigen Normalsera *Seifferts*' Angaben bestätigte.

Zum Vergleiche machte *Schou* Versuche mit unempfindlichen Tieren, und zwar mit Kaninchen und Meerschweinchen. Beim Kaninchen fand sich das von *S.* angegebene Verhalten, also Unwirksamkeit des inaktiven Serums, in der Mehrzahl der Fälle, bei den Versuchen am Meerschweinchen sogar regelmäßig.

Auch in seinen Versuchen mit Choleravibrionen fand *Schou* fast stets einen Unterschied im Verhalten des Menschenserums und des Serums unempfänglicher Tiere (Kaninchen und Meerschweinchen).

Die Versuche von *Schou* an den Endotoxinbildnern Typhus und Cholera bilden also im großen ganzen eine Bestätigung der *Seiffert*'schen Ergebnisse.

Dagegen schließt sich *Schou* den Folgerungen, die *Seiffert* aus seinen Versuchen zieht, daß man nämlich das geschilderte Verhalten des inaktiven Serums als ein Symptom der Empfänglichkeit oder Immunität auffassen müsse, nicht an.

Er sagt: »Die Befunde könnten wenigstens in den von uns untersuchten Fällen auch ganz anders und einfacher erklärt werden, nämlich durch die Annahme, daß die thermostabilen bakteriziden Serumstoffe, die in diesen Versuchen zum Ausdruck kommen, nicht oder doch nur in geringem Grade elektiv gegenüber verschiedenen Bakterienarten wirken, und daß das Serum bestimmter Tierarten, in unserem Falle das menschliche Serum, in der Regel überhaupt mehr von diesen Sfoffen enthält, als die Sera anderer Tierarten, sodaß seine Wirkung allen von uns untersuchten Bakterien gegenüber durchschnittlich stärker ist«.

Wenn man davon absieht, daß *Schou* über die theoretische Deutung der Versuchsergebnisse anderer Ansicht ist als *S.*, so scheint *Schou's* Arbeit im wesentlichen eine Bestätigung der *Seiffert*'schen Resultate zu bringen und in diesem Sinne weist auch *S.*, in der zweiten Arbeit auf *Schou's* Versuche hin.

Ich kann diese Ansicht nicht ohne weiteres teilen, da *Schou's* Versuche einer schärferen Kritik nicht standhalten. *Schou* hat es nämlich versäumt, Angaben darüber zu machen, wie groß in seinen Versuchen die eingesäte Bakterienmenge gewesen ist. Anscheinend hat eine Feststellung der eingesäten Keimzahl überhaupt nicht stattgefunden. Da aber, wie mich die eigenen Versuche lehrten, gerade diese Kontrolle

von größter Wichtigkeit ist, so können von *Schou's* Versuchen nur die als einwandfrei gelten, bei denen Wachstumshemmung stattfand, während unbeschränktes Wachstum ebensogut durch eine zufällige übergroße Einsaat hervorgerufen sein kann. Hierdurch lassen sich nach Belieben sowohl Abweichungen von *S's.* Angaben — Wachstum bei drei menschlichen Normalsera — als auch eine scheinbare Bestätigung *S's.* — Wachstum bei Rekonvaleszenten und Bazillenträgern — erklären. Daß eine solche Überdosierung der Einsaat tatsächlich bisweilen stattgefunden hat, wird dadurch noch wahrscheinlicher, daß *Schou* bei verschiedenen Serumproben ein und derselben Person ungleichmäßige Resultate — abwechselnd Wachstum und Hemmung — erhielt.

S. erblickte in *Schou's* Arbeit lediglich eine Bestätigung seiner eigenen Versuchsergebnisse, ohne daß er sich den theoretischen Anschauungen *Schou's* anzuschließen vermochte. *S's.* zweite Arbeit erschien in der Deutschen med. Wochenschrift Jahrgang 43, Heft 12 im März d. J. unter dem Titel:

»Beziehungen zwischen Schutzimpfung, natürlicher Immunität und spezifischen Serumstoffen bei Typhus.«

Das neue an dieser Arbeit, die sich auf die Verhältnisse bei Typhus beschränkt, ist die Ausdehnung der Versuche auf Sera, die von typhusschutzgeimpften Leuten stammen, während *S.* im übrigen seine Angaben über das eigenartige Verhalten des menschlichen und tierischen inaktiven Serums je nach dem Vorhandensein oder Fehlen einer Typhus-Immunität aufrecht erhält.

So gibt er an, das Serum von Leuten, die Typhus überstanden haben, könnte seine Eigenschaft, Typhusbazillen gegenüber unwirksam zu sein, oft mehrere Jahre, selbst mehr als 10 Jahre bewahren, ohne daß sich dafür eine bestimmte Regel aufstellen lasse, da andererseits das Serum auch schon nach einem Jahre wieder sein normales Verhalten zeigen könne.

Ähnliche Verhältnisse wie bei früher Typhuskranken finden sich nun nach *S.* auch bei den gegen Typhus Schutzgeimpften, indem auch durch die Impfung das inaktivierte Serum unwirksam werde gegen Typhusbazillen. Nach ein bis zwei Jahren soll diese Reaktion noch in $^1/_2$—$^2/_3$ der Fälle positiv sein.

Bei einer größeren Versuchsreihe mit Seris, deren Besitzer vor erst 3 Wochen schutzgeimpft waren, ergab sich eine positive Reaktion, also Hemmungsausfall, sogar in 94 von 100 untersuchten Fällen. Bei Kontrollversuchen mit Ruhrbazillen vom Typus Flexner zeigten die Sera gegen diese Bazillen unverändert hemmende Eigenschaften wie das Serum normaler Individuen, woraus *S.* eine Spezifizität der Umstimmung des Serums durch die Schutzimpfung folgert. *Seifferts* zweite Arbeit schließt mit einem Ausblick auf eine eventuelle praktische Verwertung der von ihm beobachteten paradoxen Reaktion:

»Für die Praxis dürfte die Erscheinung bedeutungsvoll werden, da sie die Möglichkeit geben kann, aus dem Vorhandensein wachstumshemmender Stoffe auf eine Empfänglichkeit des Individuums für eine Typhuserkrankung zu schließen. Gleichzeitig könnte sie ein Mittel sein, die Wirksamkeit der Impfstoffe zeitlich

und individuell, sowie verschiedene Darstellungsweisen der Impfstoffe auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen«.

Zweifellos mutet die *Seiffert*'sche Immunitätshypothese, besonders in der ersten Arbeit, reichlich kühn an. *S.* setzt den normalen Mangel an thermostabilen Hemmungsstoffen bei unempfänglichen Tieren in Parallele zum sekundären, erworbenen Mangel an diesen Stoffen bei sekundärer, durch überstandene Erkrankung erworbener Immunität. Aus der angeblichen Regelmäßigkeit des Zusammentreffens von Immunität und Unwirksamkeit des inaktiven Serums folgert *S.*, daß man die Unwirksamkeit des inaktiven Serums als ein Symptom der Immunität zu deuten habe, unbekümmert um das paradoxe des behaupteten Zusammenhanges, der all unseren serologischen Denkgewohnheiten zuwiderläuft.

Mußte man also nach der ersten Arbeit *S.'s* stark dazu neigen, für die behauptete paradoxe Erscheinung nach einer anderen Erklärung zu suchen, wie dies auch *Schou* getan hat, und mehr ein zufälliges Zusammentreffen anzunehmen, so scheint die *Seiffert*'sche Annahme an Wahrscheinlichkeit — und damit die ganze Untersuchung an Wichtigkeit — zu gewinnen durch den nach *S.* gleichsinnigen Ausfall der Versuche an geimpften Personen und die Angabe *S's.* über die Spezifizität der Serumumstimmung.

Immer vorausgesetzt natürlich, daß die experimentellen Grundlagen *S's.* ihre Richtigkeit hatten.

Die ganze Frage schien jedenfalls ein großes theoretisches und praktisches Interesse zu bieten: Theoretisch, da *S's.* Anschauungen versprachen, wichtige

Aufklärungen auf dem noch so dunklen Gebiete der natürlichen Immunität zu bringen und Beziehungen der natürlichen zur erworbenen Immunität aufzudecken. Interessieren mußte es auch, daß diese Aufklärung gerade von den bakteriziden Stoffen des inaktivierten Serums herkommen sollte, die bisher von der Forschung recht stiefmütterlich behandelt worden waren.

Ein praktisches Interesse lag in dem schon von *S.* im Schlusse seiner zweiten Arbeit angedeuteten Sinne vor, und geradezu aktuell war die ganze Frage dadurch geworden, daß die Typhusschutzimpfung, deren großer Wert sich erst während des Krieges herausgestellt hat, in den Bereich der Untersuchungen gezogen wurde.

Aus den angeführten Gründen schien die Frage einer eingehenderen Prüfung durch eigene Versuche wert zu sein.

Vor einer Besprechung der bei den Versuchen angewandten Technik sei erst noch auf die Angaben eingegangen, die sich in der Literatur über die bakteriziden Stoffe der inaktivierten Blutflüssigkeiten finden. Diese Angaben sind nicht all zu reichlich, da sich das Hauptinteresse der Forschung mit den wirksamen Stoffen des aktiven Blutes und Serums beschäftigt hat.

Die Literatur.

Der Entdecker der Inaktivierbarkeit des defibrinierten Blutes durch Erwärmen auf 56° C ist *Nuttal* (1888), überhaupt einer der ersten, die ausgedehntere Versuche über die Bakterizidie des Blutes anstellten.

Die eigentliche Grundlage unserer Kenntnisse von der bakteriziden Wirkung der Blutflüssigkeiten bilden

aber erst die Forschungen *Hans Buchners* und seiner Schüler. *Buchner* bestätigte *Nuttals* Entdeckung der Inaktivierbarkeit des Blutes und zeigte, daß bakterizide Eigenschaften auch dem Blutplasma und Blutserum zukommen. Das in Blut, Plasma und Serum enthaltene wirksame Prinzip, das durch einhalbstündiges Erwärmen auf 56° C zerstört wird, ist nach *Buchner* eine fermentartige Substanz, der er den Namen Alexin beilegte. Die chemische Isolierung des Alexins ist nicht gelungen, wohl aber ist es durch eine Reihe physikalisch-chemischer Eigenschaften so weit charakterisiert, daß man es von gewissen anderen in den Körperflüssigkeiten und den Formelementen des Blutes vorkommenden bakteriziden Substanzen in der Theorie trennen muß.

Buchner hält das Alexin für einen durchaus einheitlichen Körper, durch den sowohl die bakterizide wie die hämolytische Fähigkeit des Serums bedingt sein soll. Später wurde von *Ehrlich* und *Morgenroth* für die hämolytische, dann aber auch für die bakteriolytische Wirkung des Serums (von *R. Pfeiffer, Moxter, Wechsberg*) nachgewiesen, daß der wirksame Körper komplexer Natur ist und nach *Ehrlich's* Nomenklatur aus dem thermostabilen Ambozeptor und dem thermolabilen Komplement besteht. *Buchner* selbst konnte sich mit dieser Anschauung nicht befreunden, hielt vielmehr an der Einheitlichkeit seines Alexins fest. Da heute aber *Ehrlich's* Auffassung und Terminologie die allgemein übliche ist, so ist der *Buchner*'sche Ausdruck Alexin etwas antiquiert, und wir verstehen heute unter Komplement im allgemeinen dasselbe, was *Buchner* als Alexin bezeichnete.

Die Frage, ob die bakterizide Fähigkeit des Blutes eine hinreichende Ursache wäre zur Erklärung der natürlichen Immunität, ist von einer großen Anzahl von Forschern zum Gegenstand eingehender Untersuchungen gemacht worden, ohne daß bis heute eine eindeutige Lösung des Rätsels gelungen wäre. Bei diesen Untersuchungen ergab sich wiederholt, daß die bakterizide Substanz, die man studierte, die Bedingungen der üblichen Definition des Komplements nicht erfüllte, insofern sie bei einhalbstündigem Erwärmen auf 56° C nicht zerstört wurde. Trotzdem wurde der Körper in einigen Fällen als ein »relativ thermostabiles Komplement« angesprochen.

Die ersten Mitteilungen über relativ thermostabile bakterizide Serumkörper stammen von *Kruse* und *Bonaduce* (1893) sowie von *Wilde* (1901) und *Bail* (1903). Diese Forscher geben übereinstimmend an, daß das Kaninchen-Serum bei einhalbstündigem Erwärmen auf 56° C seine bakterizide Kraft gegen Milzbrand nicht verliere, sondern nur die Wirkung auf Typhus- und Cholerabazillen. Um das Kaninchen-Serum auch gegen Milzbrand zu inaktivieren, ist nach *Bail* $^1/_4$ bis $^1/_2$ stündiges Erwärmen auf 63° C, nach *Wilde* 24stündiges Erwärmen auf 57° C notwendig. *Wilde* hält diesen Körper für einen spezifischen, nicht mit dem Komplement identischen Antikörper, nach *Bail* ist er ein zweites thermostabileres, neben dem gewöhnlichen vorhandenes Komplement, das ebenso wie dieses fähig ist, den Ambozeptor des Hunde- und Kaninchen-Serums zu komplettieren. *Bail* und *Pettersson* fanden ferner (1903) ein solches zweites thermo-

stabileres Komplement im Serum der Ratte und des Pferdes.

Eine der im Kaninchenserum vorgefundenen analoge gegen Milzbrand spezifisch wirksame Substanz wurde (1904) von *Pirenne* im Rattenserum vorgefunden. *Pirenne* wies mit Sicherheit die Nichtidentität dieser Substanz mit dem Alexin nach und zwar auf Grund folgender Eigenschaften derselben:

1. Thermostabilität bei 40 Minuten Erhitzen auf 56° C.
2. Keine Zerstörung durch direktes Sonnenlicht.
3. Keine Hemmung der Substanz durch Antiratten-alexinsera.
4. Wirksamkeit bei 0 Grad.
5. Unwirksamkeit bei Neutralisation des Serums, während das Alexin dabei wirksam bleibt.
6. Auch nach monatelangem Aufbewahren des Serums im Eisschrank tritt kein Verlust an Wirksamkeit ein, während das Alexin schon nach einigen Tagen seine Wirksamkeit einbüßt.

Die Herkunft der fraglichen Substanz konnte *Pirenne* noch nicht nachweisen.

Horton bestätigte 1906 *Pirennes* Resultate und fand weiter, daß die anthrakozide Substanz nur bei der erwachsenen Ratte thermostabil ist (Zerstörung erst bei $^1/_2$ stündigem Erhitzen auf 68° C.), während sie bei der jungen Ratte schon bei 58° C zerstört wird.

Vollständige Aufklärung in der Frage der milzbrandfeindlichen thermostabilen Substanz des Serums brachten die Arbeiten von *Gruber* und *Futaki* (1906/07). Sie zeigten zunächst, daß völlig klar zentrifugiertes

Plasma der Ratte und des Kaninchens gegenüber Milzbrand vollständig wirkungslos ist, trotz intensiver Wirksamkeit des Serums von demselben Tier. Dagegen hatte das Plasma volle Wirksamkeit gegen Typhus-Bazillen und rote Blutkörperchen.

Hiermit war erwiesen, daß die anthrakoziden Eigenschaften des Serums unabhängig waren von den sonstigen bakteriziden Fähigkeiten des Serums und ferner, daß die anthrakozide Substanz im normalen Blut resp. Plasma nicht vorkomme, sondern erst bei der Gerinnung ins Serum übergehe. Dann gelang der Nachweis, daß als Quelle der anthrakoziden Substanz die Blutplättchen anzusehen seien, denn diese gaben an Watte- oder Stauungslymphe oder inaktiviertes Serum in kurzer Zeit Stoffe ab, die spezifisch gegen Milzbrand, nicht aber gegen andere Bakterien oder rote Blutkörperchen wirksam waren. Auch waren diese Blutplättchenstoffe ebenso thermostabil bei 56° C wie die anthrakoziden Sera selbst. *Gruber* und *Futaki* bezeichneten die Substanz als »Plakanthrakozidin«.

Die Untersuchungen von *Gruber* und *Futaki* wurden von *Barreau* im selben Sinne fortgesetzt. *Barreau* prüfte Sera und Plasmen einer größeren Anzahl Tierarten (Mensch, Rind, Ziege, Schaf, Pferd, Maus, Hund und Schwein) Plakanthrakozidingehalt und zeigte, daß beim Pferd die Verhältnisse genau so liegen wie bei Kaninchen und Ratte: Unwirksamkeit des Plasmas gegen Milzbrand, Wirksamkeit gegen Typhusbazillen. Dagegen ist das Serum auch inaktiviert gegen Milzbrand sehr wirksam und die Quelle der anthrakoziden Substanz sind die Blutplättchen.

Beziehungen zwischen Immunität gegen Milzbrand und Anthrakocidingehalt des Blutes erkennt *Barreau* nicht an.

Eine andere thermostabile bakterizide Substanz wurde von *Dold* und *Ungermann* bei ihren Untersuchungen über natürliche Pneumokokkenimmunität entdeckt. Sie fanden im Blute und Plasma des Menschen Stoffe, die besonders auf virulente Pneumokokken eine bakterizide Wirkung ausüben und die bei $^1/_2$ stündigem Erhitzen auf 58° C. nicht zerstört werden. Dagegen fanden sie das Serum unwirksam.

Angaben über die von *S.* studierten gegen Typhus und andere Endotoxinbildner wirksamen thermostabilen Substanzen konnte ich in der einschlägigen Literatur nicht entdecken.

Die Versuchstechnik.

Ich gebe zunächst die *Seiffert*'sche Beschreibung seiner Versuchstechnik wörtlich wieder und bespreche dann einige unwesentliche in den eigenen Versuchen angewandte Abänderungen derselben.

S. schildert seine Technik in der zweiten Arbeit folgendermaßen:

»Durch Venenpunktion gewonnenes blutkörperchenfreies Serum wurde zu je 0,5 ccm in kleine Reagenzgläser abgefüllt und eine halbe Stunde bei 56° C erhitzt. Hierauf wird das Serum mit sehr geringen Mengen Typhusbazillen beimpft. Das Gelingen der Versuche ist in höchstem Grade davon abhängig, daß nur sehr kleine Typhusbazillen-Mengen eingesät werden. Man gibt 3—5 Ösen einer 24stündigen Typhus-Bouillon-

kultur auf 10 ccm steriler Kochsalzlösung oder Bouillon, schüttelt diese zur gleichmäßigen Verteilung der Bakterien gut durch und impft hiervon eine kleine Öse in die Serumröhrchen. Zur Kontrolle wird 0,5 ccm Bouillon mit der gleichen Menge beimpft. Die beimpften Röhrchen kommen für 18—24 Stunden in den Brutschrank. Nach Ablauf dieser Zeit wird je eine kleine Öse den Röhrchen entnommen und auf eine Drigalski-Platte ausgestrichen oder mit Agar vermischt zu einer Platte ausgegossen. Die Wachstumsunterschiede (steril, vereinzelte, unzählbare Kolonien) sind im allgemeinen so groß, daß eine genaue Auszählung der Keime nicht unbedingt nötig ist. Es ist nötig mit Hilfe einer Probeagglutination und evtl. kultureller Proben sich zu vergewissern, daß Typhusbazillen und keine anderen Verunreinigungen auf der Platte gewachsen sind«.

Was an diesen Angaben zunächst geändert wurde, betraf die Herstellung der zur Einsaat geeigneten Typhusbazillenaufschwemmung. Die eingesäte in einer Öse enthaltene Keimzahl soll nach *Seiffert* sehr klein sein; bei einem in seiner zweiten Arbeit wiedergegebenen Versuch beträgt die eingesäte Bazillenmenge z. B. 10 Keime. Es stellte sich nun heraus, daß bei genauer Befolgung der *Seiffert*'schen Vorschrift die in einer Öse der Aufschwemmung enthaltene Keimzahl viel größer ist. Man erhält dadurch direkt falsche Resultate, denn es kann dann infolge Absorbtion des Hemmungskörpers durch die übergroße Einsaat ungehemmtes Wachstum auch in solchen Seris eintreten, die bei Einsaat kleinerer Bazillenmengen Wachstumshemmung zeigen.

Es wurde daher nach häufigerem Ausprobieren die geeignete Bazillenaufschwemmung so hergestellt, daß von der 24stündigen Typhus-Bouillonkultur eine Öse auf 20 ccm Kochsalzlösung gebracht und von dieser Verdünnung mit einer Öse das Serum beimpft wurde. In den späteren Versuchen wurde zur Vermeidung der 24stündigen Bouillonkultur die geeignete Bazillenaufschwemmung meist direkt von der Agarkultur hergestellt, da Nebenversuche ergeben hatten, daß sich auch auf diese Weise eine gleichmäßige Verteilung der Bazillen erzielen läßt. Es wurden 4 Ösen einer Typhus-Agarkultur in 5 ccm Kochsalzlösung fein verrieben und hiervon eine oder mehrere Ösen — je nachdem die Einsaat kleiner oder größer geplant war — auf ein zweites Röhrchen mit 5 ccm Kochsalzlösung gebracht, aus der dann je eine Öse zur Beimpfung der Sera und der Keimzahlkontrollen diente.

Die eingesäte Keimzahl ist mit Ausnahme des ersten Versuches jedesmal angegeben. Zur Feststellung derselben wurde auf 3—4 Agarplatten je eine Öse der Bazillenaufschwemmung verrieben. Das arithmetische Mittel der auf den einzelnen Platten gewachsenen Kolonienzahlen ist als Einsaat angegeben. Die Aussaat erfolgte wie bei *Seiffert*. Zur Identifizierung der gewachsenen Kolonien diente außer der Probeagglutination die Löfflersche Malachitgrünlösung I und II, die auf sehr einfache und absolut sichere Weise Typhus, Paratyphus und Koli unterscheiden läßt.

Eigene Versuche.

Der erste Versuch umfaßt 4 Sera. Drei stammen von schutzgeimpften Personen (rumänischen Kriegsgefangenen), zum Vergleich dient das vierte Serum, das von einer nicht geimpften Person stammt.

Die Beimpfung erfolgte genau nach *Seifferts* Vorschrift: 4 Ösen einer 24stündigen Bouillon-Kultur auf 10 ccm Kochsalzlösung. Davon eine Öse zur Beimpfung der Sera. Eine Kontrolle der Einsaatmenge hat in diesem Versuch noch nicht stattgefunden.

Versuch I.

Serum Nr.	Versuchsperson	Aussaat
1	geimpft vor 9 Monaten	unzählbar
2	„ „ 9 „	„
3	„ „ 3 „	sehr viele Kol.
4	nicht geimpft	„ „ „
Bouillon-Kontrolle		∞

Resultat: Der Versuch ergab keinen Unterschied im Verhalten der Sera von Geimpften und dem der nicht geimpften Person, da alle Sera starkes Wachstum der eingesäten Keime aufweisen. Das Resultat ist aber, wie sich mit Sicherheit aus späteren Versuchen schließen läßt, auf eine Überdosierung der eingesäten Keimzahl zurückzuführen, die sowohl für das Serum des Nichtgeimpften, das doch nach *S.* bakterizid oder hemmend wirken sollte, als auch für die anderen Sera, bei denen nach *S.* dieser Ausfall zu erwarten stand,

viel zu groß war. Die Bestätigung der Angaben *S's* bezüglich des Verhaltens der Sera von Geimpften, wie sie aus dem Versuch hervorzugehen scheint, kann daher nur als eine scheinbare angesehen werden; ebenso ist es mit dem *S's.* Angaben scheinbar widersprechenden Resultat bei Serum No. 4. Leider konnte aus äußeren Gründen — die Versuchspersonen waren inzwischen aus dem Lazarett entlassen — eine Wiederholung des Versuches mit kleinerer Einsaat nicht vorgenommen werden. Der Versuch hat deshalb für die Arbeit, da diese im übrigen andere Resultate ergab, nur die Bedeutung einer allgemeinen Orientierung und wird hier nur wiedergegeben, um auf die Versuchsfehler hinzuweisen, die zu Trugschlüssen führen können.

Der folgende Versuch enthält 6 Sera, 3 von geimpften Leuten, 2 von Typhus-Rekonvaleszenten, 1 von einer nicht geimpften Normalperson.

Versuch II.

Einsaat: 62 Keime.

Serum Nr.	Versuchsperson	Aussaat
5	geimpft vor 3 Monaten	2
6	„ „ 4 „	0
7	„ „ 5 „	0
8	Ty.-Rekonvaleszent vor 5 Monaten erkrankt.	1
9	„ „ seit 6 Tagen entfiebert	0
10	Normalperson, nicht geimpft	0
Bouillon-Kontrolle		unzählbar

Resultat: Vollständige oder relative Wachstumshemmung bei allen Seris, ohne Unterschied ob sie von Geimpften, Rekonvaleszenten oder Normalperson stammen.

Recht lehrreich war eine Wiederholung des Versuches mit denselben Seris (ausgenommen No. 9) aber Einsaat einer zu großen Bazillenmenge; es war dies gewissermaßen die Gegenprobe auf den Versuch II und es trat diesmal bei den Seris No. 5 und 7 schwaches Wachstum, bei No. 6, 8, und auch bei dem Normalserum No. 10 sehr reichliches Wachstum ein. Das Resultat war also analog dem mit Versuch I erhaltenen.

Der nächste Versuch sollte zeigen, ob Wachstumshemmung bei inaktivierten Seris normaler Personen eine regelmäßige Erscheinung vorstellt. Der Versuch enthält nur Sera von nicht geimpften Leuten. Derartige Sera waren nicht ganz leicht zu beschaffen, da es in Lamsdorf fast nur Soldaten und Gefangene gibt, die sämtlich geimpft sind. Wir erhielten die meisten Sera durch die Liebenswürdigkeit der Breslauer Hautklinik. Aus äußeren Gründen konnten die Sera nicht sofort verarbeitet werden und haben nach ihrem Eintreffen noch 12 Tage bei Zimmertemperatur gestanden.

Versuch III.

Einsaat: 70 Keime	
Serum Nr.	Aussaat
11	0
12	0
13	0
14	0
15	0
16	0
17	0
18	0
19	∞
20	0
21	0
22	unzählbar
23	0
24	0
25	unzählbar
26	0
27	6
Bouillon-Kontrolle	∞

Resultat: Es fand bei 3 Seris ungehemmtes Wachstum statt, bei den übrigen Wachstumshemmung. Das Verhältnis der hemmenden Sera zu den nicht hemmenden stellt sich also auf 14 : 3. Der Versuch bestätigt *S's.* Angaben über das fast regelmäßige Vorkommen bakterizider Eigenschaften im inaktivierten menschlichen Normalserum. Es ist bemerkenswert, daß die meisten Sera das Stehen bei Zimmertemperatur ohne Schaden für den Rest ihres bakteriziden Vermögens, der ihnen nach dem Inaktivieren noch verbleibt, vertragen haben, während das Komplement bekanntlich seine Wirksamkeit gegen Bakterien und rote Blutkörperchen schon nach einigen Tagen der Aufbewahrung im Eisschrank verliert. Die größere Resistenz des hemmenden Körpers, die sich schon in der Thermostabilität äußert, macht sich eben auch gegenüber einer Schädigung durch längeres Aufbewahren bemerkbar. Die Sera No. 13, 14 und 23, die gelegentlich späterer Versuche nach weiteren 6 Wochen nochmals beimpft wurden, zeigten auch da noch keinen Verlust ihrer Wirksamkeit. Mußte man nach diesem Versuch *S's.* Angaben über das Verhalten des inaktivierten menschlichen Normalserums als bestätigt ansehen, so genügte der negative Ausfall des Versuches II noch nicht zur definitiven Widerlegung von *S's.* Angaben über die Serumumstimmung durch Impfung und Rekonvaleszenz im Sinne eines Verlustes der hemmenden Eigenschaften. Im nächsten Versuche wurde daher eine größere Anzahl Sera Geimpfter nach Ablauf verschieden langer Zeiten seit dem Impftermin geprüft.

Der Versuch enthält 10 Sera Geimpfter unter Angabe des Agglutinationstiters, um gleich eine Antwort zu haben auf die Frage einer eventuellen Parallelität der Agglutinationsfähigkeit mit dem von *S.* behaupteten Phänomen, falls sich dieses sollte nachweisen lassen.

Versuch IV.

Einsaat: 60 Keime			
Serum Nr.	Versuchsperson	Agglut.-Titer	Aussaat
28	geimpft vor 6 Monaten	0	0
29	„ „ 5 „	1 : 100	0
30	„ „ 6 „	0	0
31	„ „ 5 „	0	0
32	„ „ 5 „	1 : 200	0
33	„ „ 4 „	0	0
34	„ „ 3 „	0	0
35	„ „ 3 „	0	0
36	„ „ 3 „	1 : 200	0
37	„ „ 3 „	1 : 50	0
Bouillon-Kontrolle			∞

Resultat: Unterschiedslos Hemmung der eingesäten Bazillen, ohne Rücksicht auf Datum der Impfung oder Höhe des Agglutinationstiters. Das Resultat steht also in Übereinstimmung mit Versuch II.

S. erwähnt in seiner zweiten Arbeit einen Versuch an einer größeren Reihe von Personen, die vor erst 3 Wochen geimpft waren. In 94 von 100 Fällen habe

das Serum keine hemmenden Eigenschaften mehr besessen. In Anlehnung an diesen Versuch *S's.* wurden zum nächsten Versuche Sera von Leuten benützt, bei denen die Impfung möglichst kurze Zeit zurücklag.

In der Versuchsanordnung weichen die 3 nächsten Versuche von den ersten etwas ab, und zwar auf Grund der folgenden Erwägungen: Die bisherigen Versuchsergebnisse standen im Gegensatz zu den Resultaten, die *S.* bei Geimpften und Rekonvaleszenten erzielt haben will. Was *S.* behauptet, ist ein qualitativer Unterschied im Verhalten der Sera von Immunen und Empfänglichen, selbst bei Einsaat sehr kleiner Bazillenmengen. Nun ist ein solcher qualitativer Unterschied von vorn herein unwahrscheinlich, da ein Verlust der bakteriziden Eigenschaften wohl sicherlich allmählich eintreten würde und ebenso die Rückkehr des Immunserums zum Normalzustande; d. h. das inaktive Serum hätte bei dem Verlust seiner bakteriziden Fähigkeiten eine Phase gegenüber der Norm verminderter Hemmungskraft zu durchlaufen. Diese Phase müßte sich aber bei der gewöhnlichen Versuchsanordnung, die keine quantitativen Unterschiede erkennen läßt, dem Nachweis entziehen, wenn die eingesäte Bazillenmenge noch im Wirkungsbereiche der verminderten Hemmungskraft liegt.

S. könnte also trotz des bisher negativen Ausfalls der Versuche dem Sinne nach dennoch Recht haben, wenn sich ein quantitativer Unterschied im Verhalten der Sera von Normalen und Immunen sollte nachweisen lassen. Es käme somit darauf an, bei jedem Serum die maximale

Bazillenmenge festzustellen, die von demselben noch abgetötet wird.

Dazu könnte man erstens bei allen zu vergleichenden Seris durch mehrmalige fraktionierte Einsaat bestimmter Bazillenmengen in dieselbe Serumportion Wachstum zu erzielen suchen und so bei jedem Serum aus den 24 Stunden nach jeder Einsaat vorgenommenen Aussaaten die abgetötete gesamte Einsaat ermitteln. Zweitens ließe sich auch auf andere Weise ein Unterschied in der bakteriziden Kraft zweier Sera nachweisen, nämlich durch Beimpfen verschiedener Mengen des Serums (0,1, 0,3 und 0,5 ccm) mit der gleichen Bazillenmenge. Ist die Einsaatmenge richtig gewählt, so müßte ungehemmtes Wachstum bei dem schwächeren Serum schon in einem Röhrchen mit größerer Serummenge einsetzen, als bei dem normalen Serum. Das Verfahren stellt also eine Art Titration dar und sollte ebenso wie das der fraktionierten Einsaat zur Ermittelung der Größe der bakteriziden Kraft des Serums dienen.

Die Methode der fraktionierten Einsaat wurde im folgenden Versuche angewandt und zwar folgendermaßen: die Sera wurden wie gewöhnlich zu je 0,5 ccm abgefüllt, beimpft und nach 24 Stunden die erste Aussaat gemacht. Sofort danach wurde dasselbe Röhrchen zum zweiten Male beimpft und nach weiteren 24 Stunden erfolgte die zweite Aussaat. Dasselbe wiederholte sich dann noch zum dritten Male. Die jedesmal eingesäten Bazillenmengen sind in der Tabelle angegeben.

Der Versuch enthält 5 Sera von Frischgeimpften, bei denen die Impfung 3 bis 6 Wochen zurückliegt. Das Serum No. 42 stammt von einer Versuchsperson,

deren Serum wir schon vor der Impfung (No. 10 in Versuch II) untersuchten und als wirksam befanden. Serum No. 43 stammt von demselben Typhus-Rekonvaleszenten, wie Serum N. 9 in Versuch II, nur sind in Versuch V bereits 5 Wochen seit der Entfieberung verflossen. Als Vergleich mit den Seris der Immunen diente uns das in Versuch III als bakterizid nachgewiesene Normalserum No. 15.

Versuch V.

Serum Nr.	Versuchsperson	Agglut. Titer	Einsaat I	Aussaat I	Einsaat II	Aussaat II	Einsaat III	Aussaat III
38	geimpft vor 5 Wochen	1 : 50		0		0		eingetrock.
39	geimpft vor 5 Wochen	0		0		0		0
40	geimpft vor 6 Wochen	1 : 200		0		0		0
41	geimpft vor 4 Wochen	1 : 100	**10** Keime	0	**150** Keime	0	**150** Keime	0
42	geimpft vor 3Woch. cf. Ser. Nr. 10	1 : 50		0		0		0
43	Typh.-Rekonval. seit 5 Wochen fieberfrei cf. Ser. Nr. 9	1 : 50		0		0		0
15	nicht geimpft	0		0		0		0

Resultat: Der eigentliche Zweck des Versuches, durch fraktionierte Einsaat bei jedem Serum Wachstum der eingesäten Bazillen zu erzielen, wurde nicht erreicht, da die Sera nach 3 Fraktionen eintrockneten. Der Versuch erbringt nur, in Übereinstimmung mit den ersten Versuchen, den qualitativen Nachweis hemmender Eigenschaften auch bei Seris von Leuten, die erst vor kurzem geimpft waren und bei einem Rekonvaleszenten.

Denselben Zweck verfolgte der nächste Versuch, und zwar wurde bei diesem die fraktionierte Einsaat in Kombi-

nation mit einer Titration der Sera angewandt, wie ich sie auf Seite 28 erwähnt habe, derart, daß von jedem Serum 3 verschiedene Mengen, 0,5, 0,3 und 0,1 ccm abgefüllt wurden. Die 0,3 und 0,1 ccm wurden zur Vermeidung zu schnellen Austrocknens mit physiologischer Kochsalzlösung auf 0,5 ccm Gesamtvolum gebracht. Die Einsaat wurde nach den Erfahrungen von Versuch V von vornherein höher gewählt und erfolgte in 3 Fraktionen (300, 780, 2000 Keime). Die Sera stammen zur Hälfte von frisch geimpften zur anderen Hälfte von nicht geimpften Personen.

Versuch VI.

Serum Nr.	Versuchsperson	Agglut. Titer	Serum-Menge	Einsaat I	Aussaat I	Einsaat II	Aussaat II	Einsaat III	Aussaat III
44	geimpft vor 4 Wochen	0	0,5		0		0		0
			0,3		0		7		86
			0,1		0		0		1
45	geimpft vor 6 Wochen	1 : 50	0,5		0		0		0
			0,3		0		0		0
			0,1		0		0		10
46	geimpft vor 6 Wochen	1 : 50	0,5		0		200		0
			0,3		0		0		0
			0,1		0		0		3
47	geimpft vor 5 Wochen	0	0,5		0		0		0
			0,3		0		3		0
			0,1		6		60		unzählb.
48	geimpft vor 4 Wochen	1 : 50	0,5		0		0		0
			0,3		0		0		0
			0,1	300	0	780	0	2000	1
49	nicht geimpft	0	0,5	Keime	0	Keime	0	Keime	0
			0,3		0		0		0
			0,1		0		250		1
50	„ „	0	0,5		0		4		0
			0,3		0		3		∞
			0,1		unzählb.		300		150
13	„ „	0	0,5		0		0		unzählb.
			0,3		0		0		0
			0,1		0		0		5
14	„ „	0	0,5		0		0		0
			0,3		0		0		0
			0,1		7		0		3
23	„ „	0	0,5		0		0		0
			0,3		0		0		0
			0,1		0		0		0

Resultat: Wie mir scheint hat der Versuch seinen Zweck erfüllt und den Nachweis erbracht, daß tatsächlich keine quantitativen Unterschiede in der bakteriziden Kraft inaktivierter Sera von Normalen und Geimpften bestehen. Es gelang in der zweiten und dritten Aussaat bei mehreren Seris mehr oder minder starkes Wachstum zu erzielen, während andere Sera trotz der großen Gesamteinsaat von 3080 Keimen noch immer hemmende Eigenschaften zeigten, selbst in der kleinsten angewandten Menge. Hemmung und Wachstum verteilen sich nun aber — und das ist das Entscheidende — vollkommen regellos auf die Sera Normaler und Geimpfter, wie ein Blick auf die zweite und dritte Aussaat der Tabelle zeigt.

Auffallend ist in dem Versuch die Erscheinung, daß das Wachstum nicht immer in dem Röhrchen beginnt, das die geringste Serummenge enthält.

Vgl. Serum No. 44 Aussaat II und III
Serum No. 46 » II
Serum No. 50 » III
Serum No. 13 » III

Eine Erklärung hierfür vermag ich nicht anzugeben.

Auf das eigentümliche Phänomen der alle Erwartungen übersteigenden bakteriziden Kraft der inaktivierten Sera, das sich auch im folgenden Versuch bemerkbar machte, wird noch näher eingegangen werden.

Die Sera der Geimpften des Versuches VI zeigten einen Agglutinationstiter von höchstens 1 : 50. Wenn nun auch wohl der Aggl.-Titer kein unbedingtes Kriterium für den Erfolg der Impfung, nämlich das Eintreten der Immunität ist, so erschien es doch angebracht

noch einen gleichartigen Versuch mit höher agglutinierenden Seris von Geimpften anzustellen.

Der nächste Versuch soll also den vorigen erhärten. Er enthält 6 Sera von Leuten, deren Impfung zwar schon etwas länger zurückliegt, die aber einen Aggl.-Titer von 1 : 100 zeigen, und zum Vergleiche 3 als bakterizid wirkend aus früheren Versuchen bekannte Sera. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie in Versuch VI: Die Sera wurden wieder zu 0,5, 0,3 und 0,1 ccm abgefüllt; die Beimpfung geschah in 2 Fraktionen : 85 und 2000 Keime.

Versuch VII.

Serum Nr.	Agglut.-Titer	Serum-Menge	Einsaat I	Aussaat I	Einsaat II	Aussaat II
51	1 : 100	0,5	85 Keime	0	2000 Keime	0
		0,3		0		30
		0,1		0		0
52	1 : 100	0,5		0		0
		0,3		0		300
		0,1		0		3
53	1 : 100	0,5		0		0
		0,3		0		0
		0,1		0		0
54	1 : 100	0,5		0		0
		0,3		0		1
		0,1		0		170
55	1 : 100	0,5		0		0
		0,3		0		0
		0,1		0		100
56	1 : 100	0,5		0		0
		0,3		0		unzählbar
		0,1		0		∞
13	0	0,5		0		0
		0,3		0		0
		0,1		0		25
23	0	0,5		0		0
		0,3		0		6
		0,1		0		4
49	0	0,5		0		0
		0,3		0		300
		0,1		0		10

Resultat: Das Ergebnis des Versuches deckt sich vollkommen mit dem des vorigen: bei kleiner Einsaat gleichmäßige Hemmung bei sämtlichen Seris selbst in der kleinsten angewandten Menge, bei großer Einsaat (2080 Gesamteinsaat) Wachstum und Hemmung unregelmäßig verteilt auf Geimpfte und Nichtgeimpfte.

Auch in diesem Versuch war ebenso wie in dem vorigen auffallend die Größe der bakteriziden Kraft der inaktivierten Sera. Fand sich doch in Versuch VII bei verschiedenen Seris vollständige Wachstumshemmung bei einer Gesamteinsaat von 2080, und im Versuch VI sogar von 3080 Keimen.

Man mußte sich daher die Frage vorlegen, ob nicht vielleicht durch die Fraktionierung der Einsaat eine Veränderung der bakteriziden Kraft des Serums im Sinne einer Steigerung eingetreten sein könnte, derart, daß durch eine erste im Bereiche der Hemmungskraft gelegene Einsaat das Serum für weitere Einsaaten gewissermaßen präpariert wird — ganz gleich wie man sich den Mechanismus dieses Vorganges denkt — und dann bei weiterer Beimpfung eine weit größere Bazillenmenge abtötet, als ein unpräpariertes Serum. Ein derartiges Phänomen wäre natürlich für die Bewertung der Methode der fraktionierten Einsaat von Bedeutung; ob es tatsächlich besteht ließ sich nur durch den Versuch entscheiden. Es wurden zu diesem Zweck Sera, deren bakterizide Kraft bei fraktionierter Einsaat aus den Versuchen VI und VII bekannt war, jetzt einer einmaligen Beimpfung mit einer von vornherein so groß gewählten Bazillenmenge unterzogen, daß evtl. Wachstum zu erwarten war. In der folgenden Tabelle

findet sich vergleichsweise zusammengestellt das Verhalten der Sera in diesem Versuche mit einmaliger Einsaat von 530 Keimen und bei fraktionierter Beimpfung mit den angegebenen großen Gesamteinsaatmengen.

Versuch VIII.

Serum Nr.	Serum-Menge	Fraktion. Einsaat: Summe der einzelnen Fraktionen	Aussaat: 24 Std n. d. letzt Frakt.	Einmalige Einsaat	Aussaat
53	0,1	2085	0		84
13	0,1	1080	0		6
14	0,5	3080	0	**530**	1
„	0,1	1080	0		2
44	0,1	1080	0		9

Resultat: Das Ergebnis des Versuches entsprach den Vermutungen; es wird tatsächlich bei fraktionierter Einsaat eine weit größere Bazillenmenge abgetötet, als bei einmaliger Einsaat. Denn bei einmaliger Einsaat von 530 Keimen überschreitet diese Zahl gerade eben die Grenze der bakteriziden Kraft und es findet keine vollständige Abtötung mehr statt, resp. es setzt schwaches Wachstum ein, während die gleichen Sera bei fraktionierter Einsaat Gesamtmengen von 1080 bis 3080 Keimen glatt abtöten.

Das Resultat ist so paradox, daß vergebens nach einer Erklärung dafür gesucht wurde. Gleichwohl mußte auf Grund dieses Ergebnisses die eigene Methode der fraktionierten Einsaat dahingehend kritisiert werden, daß sie nicht geeignet ist den bakteriziden Titer eines Serums quantitativ festzustellen, da durch die Fraktionierung der Einsaat die Grenze der bakteriziden Kraft

nach oben hin verschoben wird. Die Versuche, bei denen diese Methode angewandt wurde, können also keinen Anspruch darauf erheben, die absolute Größe der bakteriziden Kraft der Sera festzustellen, wie dies einer der Zwecke der Versuche war.

Sie behalten aber einmal ihren Wert im Sinne der ersten, einfacheren Versuche, da ja durch die erste Einsaat einer jeden Fraktion der qualitative Nachweis bakterizider Eigenschaften des unpräparierten Serums geliefert wird. Dann aber kann auch der Schluß, der aus den Versuchen VI und VII gezogen wurde, daß nämlich auch eine Herabsetzung der bakteriziden Kraft der Sera von Geimpften gegenüber einem Normalserum sich nicht nachweisen lasse, aufrecht erhalten werden, da ja die Veränderung der bakteriziden Kraft durch die Fraktionierung in gleicher Weise beide Kategorien von Sera betrifft. Ihren Wert als Vergleichszahlen verlieren somit die angegebenen Einsaatzahlen der einzelnen Fraktionen nicht, man darf sie nur nicht mehr absolut, als tatsächliche Titer der bakteriziden Kraft auffassen, sondern als relative Werte, die einen Vergleich der wachstumshemmenden Eigenschaften erlauben.

Da aber der absolute quantitative Nachweis der Größe der bakteriziden Kraft einer der Hauptzwecke der geschilderten Versuchsanordnung war, so wurde auf Grund des Resultates von Versuch VIII im folgenden von dieser Methode wieder Abstand genommen.

Zusammenfassend läßt sich über die Resultate der Versuche an typhusschutzgeimpften Personen sagen: es wurden untersucht die inaktivierten Sera von

29 Personen. Teils war die Impfung erst vor wenigen Wochen erfolgt, teils lag sie bereits einige Monate zurück. Der Agl.-Titer der Sera schwankte von 0 bis 1 : 200. Alle Versuche gaben das eindeutige Resultat, daß die bakterizide Kraft des inaktivierten Serums durch die Impfung nicht im Sinne einer Schwächung verändert wird, geschweige denn ganz veschwindet.

Bei den beiden bisher untersuchten Fällen von Typhus-Rekonvaleszenz war ein Verlust der bakteriziden Eigenschaften des Serums nicht nachweisbar. Die folgenden Versuche bringen eingehendere Untersuchungen über das Verhalten des Serums in der Rekonvaleszenz und längere Zeit nach Überstehen einer Typhuserkrankung. Vorher zitiere ich die Angaben *Seifferts* hierüber aus seiner zweiten Arbeit:

»Im Serum von Typhus-Rekonvaleszenten oder Personen, deren Typhuserkrankung einige Zeit zurückliegt, wachsen die Typhusbazillen in der Mehrzahl der Fälle ebenso ungehemmt, wie im Serum von Tieren, die für Typhus nicht empfänglich sind. Diese Eigenschaft behält das Serum oft mehrere Jahre nach der Erkrankung, es besteht aber keine bestimmte Regel. Sera von Individuen, die vor mehr als 10 Jahren erkrankt waren, können diese Eigenschaft in sehr ausgesprochenem Maße besitzen, während sie bei Personen, die vor 1 oder 2 Jahren erkrankt waren, wieder verschwunden sein kann.«

Ferner: »Wesentlich länger erhält sich die positive Reaktion bei Individuen, die einmal typhuskrank waren und nachträglich geimpft wurden.«

Sera von Typhus-Rekonvaleszenten waren nur mit Mühe zu beschaffen, da es sowohl in den verschiedenen Lazaretten des Inlandes, als auch in Seuchen-Lazaretten des Etappengebietes, an die ich mich wandte, selbst im Hochsommer keine Typhusfälle gab, was wohl sicherlich auf die Schutzimpfung zurückzuführen ist. Die 10 Sera des folgenden Versuches erhielt ich schließlich durch die Liebenswürdigkeit des Breslauer Allerheiligen Hospitals. Serum 83 — 91 stammen von Rekonvaleszenten, Serum No. 92 von einem Typhus-Bazillenträger, der an einer Pyelitis typhosa chronica leidet.

Versuch IX.

Serum Nr.	Versuchsperson	Agglut.-Titer	Einsaat	Aussaat
83	erkrankt vor 11 Wochen	1 : 200	10	0
			30	0
84	erkrankt vor 6 Wochen	0	10	0
			30	120
85	erkrankt vor 13 Wochen	1 : 400	10	0
			30	0
86	erkrankt vor $6^1/_2$ Wochen	1 : 400	10	0
			30	0
87	erkrankt vor 11 Wochen	1 : 400	10	0
			30	0
88	erkrankt vor 10 Wochen	1 : 200	10	0
			30	10
89	erkrankt vor 6 Wochen	1 : 400	10	0
			30	0
90	erkrankt vor $5^1/_2$ Wochen	1 : 400	10	0
			30	0
91	erkrankt vor 7 Wochen	1 : 400	10	0
			30	0
92	Bazillenträger, erkrankt vor 7 Mon.	0	10	0
			30	76

Zur Beimpfung wurde jedes Serum auf 2 Röhrchen zu je 0,5 ccm abgefüllt, die gleichzeitig mit den in der Tabelle angegebenen verschieden großen Bazillenmengen beimpft wurden.

Resultat: Bei der kleinen Einsaat von 10 Keimen lassen sich bakterizide Eigenschaften bei sämtlichen Seris nachweisen. Bei der Einsaat von 30 Keimen setzt bei 3 Seris (No. 84, 88 und 92) schwaches Wachstum ein, während bei sämtlichen übrigen Wachstumshemmung stattfindet.

An einer Wiederholung des Versuches mit größerer Einsaat bei den hemmenden Seris, um festzustellen, wie weit sich ungefähr die bakterizide Kraft auch bei diesen Seris erstreckt, wurde ich leider durch eigene Erkrankung verhindert.

In den folgenden Versuchen dienten als Versuchspersonen . russische Kriegsgefangene, die nach ihrer Angabe seiner Zeit einen Typhus überstanden hatten.

Versuch X.

Einsaat: 460 Keime				
Serum Nr.	Jahr der Erkrankung	Datum der Impfung	Agglut.-Titer	Aussaat
57	1915	XII. 15	1 : 100	2
58	1915	? 1915	0	0
59	1910	IX. 15	0	0
60	1915	VIII. 15	0	0
61	1912	XII. 15	0	0
62	1916	XI. 16	1 : 100	unzählbar
63	1914	X. 16	1 : 100	15
64	1915	VIII. 15	0	0
65	1912	1914/15	0	0
66	1905	V. 15	0	0
67	1913	V. 16	1 : 100	0
68	1913	V. 15	0	0
69	1905	VII. 15	0	13
70	1916/17	? 1917	0	0
71	1915 u. 17	III. 17	1 : 200	0
72	1915	VIII. 15	1 : 100	0

Selbstverständlich genügte die bloße Behauptung der Leute nicht, sondern es wurde eine genaue Anamnese über Dauer der Erkrankung, Höhe des Fiebers, das Auftreten von Durchfällen und Bewußtlosigkeit aufgenommen, und nur das Serum von Personen mit einwandfreier Typhusanamnese wurde verwandt. Sämtliche Leute waren natürlich außerdem in der Gefangenschaft geimpft und boten also besonders günstige Aussichten für einen nach *S.* positiven Ausfall des Versuches. Die Einsaat war bei diesem Versuch ziemlich groß gewählt, sie betrug 460 Keime.

Resultat von Versuch X: Es zeigte nur ein Serum (No. 62) schrankenloses Wachstum, die meisten dagegen so starke Bakterizidie, daß keine einzige Kolonie wuchs.

Als Ergänzung zu Versuch X wurde im folgenden Versuch von Serum No. 62 und den 3 anderen Seris, die vereinzelte Kolonien hatten wachsen lassen, nochmals je eine neue Portion mit kleinerer Einsaat (100 Keime) beimpft.

Versuch XI.

Einsaat: 100 Keime		
Serum Nr.	Aussaat nach 24 Std.	48 Std.
57	0	0
62	1	unzählbar
63	0	0
69	0	0

Resultat: Wie zu erwarten, zeigten No. 57, 63 und 69 jetzt vollständige Bakterizidie. Auch Serum No. 62 ließ in der nach 24 Stunden vorgenommenen Aussaat nur 1 Kolonie wachsen, damit war aber seine hemmende Kraft erschöpft und in einer zweiten Aussaat nach 48 Stunden war unbeschränktes Wachstum eingetreten.

Analog dem vorigen ist der folgende Versuch. Die Sera stammen von 3 Leuten, die der Anamnese nach während des Krieges einen schweren Typhus überstanden haben und außerdem geimpft sind.

Versuch XII.

Einsaat: 410 Keime				
Serum Nr.	Jahr der Erkrankung	Impfung	Agglut.-Titer	Aussaat
73	III./IV. 1917	1917	1 : 100	0
74	1914/15	1915	0	0
75	1915	1915	1 : 200	0

Resultat: Vollständige Bakterizidie bei allen 3 Seris.

Hiermit wurden die Versuche über Typhus-Immunität durch Erkrankung abgeschlossen. Sie hatten das Gesamtergebnis, daß stets bakterizide Eigenschaften im inaktiven Serum nachgewiesen werden konnten, sowohl bei Rekonvaleszenten, als auch bei Personen, die vor längerer Zeit Typhus überstanden hatten und außerdem schutzgeimpft waren.

Versuche über Paratyphus B.

Eine Anzahl gegen Ende des Sommers in Lamsdorf auftretender Fälle von Paratyphus B war die Veranlassung, die Untersuchungen auch auf diese Erkrankung auszudehnen.

Über Paratyphus äußert sich *S.* in seiner ersten Arbeit folgendermaßen:

»Die Untersuchungen mit Stämmen aus der Paratyphus-Gruppe zeigen konstant wiederkehrende Verschiedenheiten im Verhalten der Tiersera. Im Serum

von Mensch, ferner in den Sera von Rind und Schwein findet meistenteils eine Abtötung oder Entwicklungshemmung der Paratyphus B-Stämme statt, während andere Tiersera in keiner Weise das Wachstum dieser Bazillen hemmen. Es wurden aber unter den untersuchten Menschensera bedeutend weniger Sera mit bakteriziden Eigenschaften, als bei den Typhusversuchen gefunden. Ob nur diese Individuen empfänglich für Paratyphus B sind und die große Zahl von Individuen, deren inaktives Serum Paratyphus B-Bazillen nicht schädigt, immun sind, muß zunächst dahingestellt bleiben.«

Die eigenen Untersuchungen betrafen nun gerade Leute, die wegen der vor kurzem überstandenen Erkrankung mit großer Wahrscheinlichkeit als immun gegen Paratyphus B angesehen werden mußten. Wir nahmen zu den Versuchen nur Sera, die agglutinierende Eigenschaften aufwiesen, was durchaus nicht bei allen Patienten der Fall war, aus deren Stuhl Paratyphus B-Bazillen gezüchtet worden waren. Wegen der Verschiedenartigkeit des Krankheitsbildes, das der Paratyphus darbietet, glaubte ich allein in der agglutinierenden Eigenschaft des Serums eine Gewähr dafür zu haben, daß der Erreger tatsächlich als Antigen auf den Organismus gewirkt und also wahrscheinlich auch Immunität erzeugt hatte.

Der folgende Versuch enthält 4 Sera von Paratyphus B-Rekonvaleszenten, deren Erkrankung 2 bis 3 Wochen zurückliegt.

Versuch XIII

Einsaat: 120 Keime.			
Serum Nr.	Serum-Menge	Agglut.-Titer	Aussaat
76	0,5	1 : 400	∞
77	0,5	1 : 200	11
78	0,5	1 : 200	500
79	0,2	1 : 200	200

Resultat: Angedeutete Hemmung nur bei dem Serum No. 77, bei allen übrigen mehr oder minder reichliche Vermehrung der eingesäten Keime.

Um zu entscheiden, ob dieses Resultat vielleicht durch zu große Einsaat bedingt war, diente der folgende Versuch. Dieser enthält wieder 4 Rekonvaleszentensera, von denen 3 mit denen des vorigen Versuchs identisch sind, außerdem zum Vergleich 2 Normalsera.

Um zu sehen, wie weit die bakterizide Kraft des Serums gegenüber Paratyphus B geht, wurden 3 Sera, von denen genügend vorhanden war, auf 3 Röhrchen zu je 0,5 ccm abgefüllt und gleichzeitig mit den in der Tabelle angegebenen steigenden Einsaatmengen beimpft.

Versuch XIV.

Serum Nr.	Serum-Menge	Agglut.-Titer	Einsaat	Aussaat
77	0,5	1 : 200	20	unzählbar
78	0,5	1 : 200	20	unzählbar
79	0,1	1 : 200	20	4
80	0,5	1 : 400	20	0
	0,5		40	60
	0,5		60	unzählbar
Normalserum 81	0,5	0	20	0
	0,5		40	0
	0,5		60	0
Normalserum 82	0,5	0	20	0
	0,5		40	400
	0,5		60	∞

Resultat: Bei der kleinen Einsaat von 20 Keimen bei einem Rekonvaleszentenserum (No. 80) absolute, bei einem (No. 79) relative Hemmung, bei beiden andern schrankenloses Wachstum, sonderbarer Weise auch bei dem Serum No. 77, das bei der viel größeren Einsaat des vorigen Versuches eine Andeutung hemmender Eigenschaften zeigte. Die beiden Normalsera des Versuches zeigen bei kleinster Einsaat Hemmung, aber schon bei der wenig größeren Einsaat von 40 Keimen tritt in dem einen starkes Wachstum auf.

Im ganzen ist der Ausfall der Versuche mit Paratyphus zu ungleichmäßig, als daß aus ihnen eine Regel abgeleitet werden könnte, umsomehr als *S.* selbst angibt, daß auch menschliche Normalsera dem Paratyphus B-Bazillus gegenüber bakterizide Eigenschaften häufig vermissen lassen. So erklärt sich wohl der Hemmungsausfall bei den Seris No. 77 und 78, während das entgegengesetzte Resultat bei Serum No. 79, das in der geringen Menge von 0,1 ccm angewandt wurde, und bei dem besonders hoch agglutinierenden Serum No. 80 dafür spricht, daß eine Serumumstimmung mit Verlust der bakteriziden Eigenschaften durch die Erkrankung nicht stattfindet.

Schluß.

Meine Nachprüfung der Versuche *Seifferts,* soweit sie sich auf eine angebliche Serumumstimmung durch erworbene Immunität bei Typhus und Paratyphus B bezogen, hat in keinem Fall eine Bestätigung der Resultate *Seifferts* ergeben. Über den Grund der Abweichungen meiner Versuchsergebnisse von denen *Seifferts* vermag ich bisher keine Vermutung zu äußern,

da die von *S.* in seiner zweiten Arbeit angekündigte Veröffentlichung näherer Einzelheiten bisher leider noch nicht erfolgt ist.

Eine Nachprüfung der *Seiffertschen* Tierversuche, aus deren Resultaten ja seine Immunitätshypothese hervorgegangen ist, mußte wegen des unverhältnismäßig hohen Kostenaufwandes, den derartige Versuche in dieser Zeit verursacht hätten, unterbleiben.

Sollten übrigens auch die Resultate der Tierversuche *Seifferts* zu Recht bestehen — und nach den im großen Ganzen bestätigenden Versuchen *Schous* ist das wohl der Fall, — so muß man jetzt trotzdem die *Seiffertsche* Hypothese ablehnen. Diese steht und fällt mit der Frage, ob das serologische Symptom für Immunität das gleiche ist bei spontaner und bei erworbener Immunität, denn erst das gleichsinnige Verhalten des Serums bei erworbener Immunität hätte die in den Tierversuchen erhobenen Befunde über das Niveau des rein Zufälligen hinausgeschoben.

Zusammenfassung.

1. Im Menschenserum finden sich, — wie zuerst *S.* festgestellt hat — meist auch nach der Inaktivierung noch Stoffe, die auf Typhus - und Paratyphus B - Bazillen abtötend wirken. Das Vorkommen der gegen Paratyphus B wirksamen Stoffe ist offenbar weit weniger regelmäßig als bei Typhus.

2. Ein Verlust dieser Stoffe durch erworbene Immunität — sei es infolge von Schutzimpfung oder überstandener Erkrankung — tritt nicht ein.

3. Durch fraktionierte Beimpfung einer bestimmten Menge inaktivierten Menschenserums mit Typhus-

bazillenmengen, deren erste im Bereiche der Hemmungskraft des Serums liegt, wird der bakterizide Titer des Serums gegenüber Typhusbazillen gesteigert.

Herrn Privatdozent Dr. *Walter* sage ich für die Anregung zu der Arbeit und Herrn Prof. Dr. *Selter* für liebenswürdige Übernahme des Referats meinen ergebensten Dank.

Literatur-Verzeichnis.

Nuttall: Zeitsch. f. Hyg. Bd. 4. 1888.
Kruse: Zieglers Beiträge 1893. S. 333.
Bonaduce: Zieglers Beiträge 1893.
Bail: Zentralbl. f. Bakt. Bd. 33. 1903.
Wilde: Zeitsch. f. Hyg. Bd. 37. 1901.
Bail und *Pettersson:* Zentrbl. f. Bakt. Bd. 34. 1903.
Pirenne: Zentralbl. f. Bakt. Bd. 36. 1904.
Horton: Journal of Infekt. diseases. vol. 3. 1906.
Gruber und *Futaki:* Dt. med. Wochensch. 1907. 39.
Dieselben: Münch. med. Wochensch. 1906. 6. 1907. 6.
Barreau: Arch. f. Hyg. Bd. 70.
Dold: Arb. a. d. Kais. Ges. Amt. Bd. 36.
Ungermann: Arb. a. d. Kais. Ges. Amt Bd. 36.
Buchner: Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. 5. 1889.
Derselbe: Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. 6. 1889.
Derselbe: Arch f. Hyg. Bd. 10. 1891.
Derselbe: Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. 7. 1890.
Derselbe: Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. 10. 1891.
Derselbe: Arch. f. Hyg. Bd. 17. 1893.
Ehrlich und *Morgenroth:* Berl. Klin. Wochensch. 1899. Nr. 1 u. 22.
Dieselben: Berl. Klin. Wochensch. 1900 Nr. 21 u. 31.
Dieselben: Berl. Klin. Wochensch. 1901 Nr. 10, 21 u. 22.
Pfeiffer: cit. nach Kolle-Wassermann. Bd. II 1. S. 361. 1913.
Moxter: Centralbl. f. Bakt. Bd. 26. S. 344. 1899.
Wechsberg: Zeitschr. f. Hyg. Bd. 39. 1902.
Seiffert: Deut. Med. Wochensch. Jahrg. 38. Nr. 7.
Derselbe: Deut. Med. Wochensch. Jahrg. 43 Nr. 12.
Schou: Zeitschr. f. Hyg. Bd. 75.

Lebenslauf.

Als Sohn des Kaufmanns *Rudolf Wöhlisch* wurde ich, *Edgar Wöhlisch,* evang. Konfession am 6. IX. 1890 zu Danzig geboren. Ich besuchte das Kgl. Gymnasium zu Danzig und bestand Ostern 1909 die Reifeprüfung.

Ich studierte Medizin an den Universitäten München und Königsberg Pr. November 1911 bestand ich in Königsberg die ärztliche Vorprüfung, Juli 1914 das Staatsexamen.

August 1914 erhielt ich wegen des Kriegszustandes die Approbation.

Von August 1914 ab leistete ich Heeresdienst als landsturmpflicht. Arzt am Fest.-Haupt-Laz. zu Königsberg, am Kriegs-Laz. Brest-Litowsk und am Gefangenen-Laz. Lamsdorf O. S.

Am 1. XI. 1917 wurde ich krankheitshalber aus dem Heeresdienst entlassen und bin seitdem als Studierender der Chemie und Physik an der Kgl. techn. Hochschule zu Danzig-Langfuhr immatrikuliert.